

Approved For Release 2009/07/16 : CIA-RDP80T00246A007300080002-1

Page Denied

Next 1 Page(s) In Document Denied

Академия наук СССР
Биофизика
Том III. Вып. 3. 1958 г.

Д. М. Спитковский, П. И. Цейтлин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДА И ВХОДЯЩЕЙ В ЕГО
СОСТАВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ
ВИСКОЗИМЕТРИИ

D. M. Spitskovskii
P. I. Tsietlin

DN-otide

DNA - Mf. Wt - Viscosity

БИОФИЗИКА

Том III, вып. 3

1958

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДА
И ВХОДЯЩЕЙ В ЕГО СОСТАВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ
МЕТОДОМ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Д. М. СПИТКОВСКИЙ, П. И. ЦЕЯТЛИН

Институт экспериментальной биологии АМН СССР

В настоящее время еще нельзя считать разрешенным вопрос о величине молекулярного веса дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК): является ли определяемый молекулярный вес характеристикой нативных молекул ДНК, либо нашему измерению подвергаются молекулы, уже частично подвергшиеся деструкции или, наоборот, агрегированные в процессе выделения.

Разрешить этот вопрос может только прямое определение молекулярного веса ДНК, входящей в дезоксирибонуклеопротеид (ДНП), без разделения последнего на составные компоненты.

За последнее время рядом работ на примере естественных и искусственных нуклеопротеидов показано [1—4], что как при ступенчатой депротенизации первых, так и при синтезе искусственных ДНП, несмотря на постепенно уменьшающееся или увеличивающееся количество белка соответственно, характеристическая вязкость нуклеопротеидов не изменяется. Постоянство вязкости ДНП имеет место в довольно большом диапазоне содержания белка в ДНП (15—25% вплоть до 80—90%), причем при содержании белка меньше 15—25% происходит резкий скачок вязкости от последней характерной для ДНП к вязкости ДНК [2; 3]. В нашей лаборатории на примере искусственных и естественных нуклеопротеидов было показано [1—3], что вязкость ДНК примерно на 40—60% выше вязкости ДНП как в случае ступенчатой депротенизации последнего, так и в случае синтеза искусственного комплекса ДНК — белок. При этом закономерности были показаны на ДНК из печени и из поджелудочной железы. При освобождении ДНК от белка (ДНК из зубной железы) скачок вязкости в 2 раза был показан и другими авторами [5]. Интересно отметить, что подобные конфигурационные изменения ДНК наблюдаются и при ряде внешних воздействий на последнюю [6].

Таким образом, на основании собственных и литературных данных мы можем заключить, что при образовании ДНП из ДНК при 15—25%-ном содержании белка наблюдается точка инверсии ДНК в ДНП [6], сопровождающаяся примерно двукратным уменьшением вязкости вновь образованной молекулы ДНП по сравнению с исходной ДНК. С дальнейшим увеличением количества белка вязкость ДНП остается в довольно широком пределе постоянной.

Чем же можно объяснить подобные конфигурационные изменения, сопровождающиеся двукратным изменением вязкости? Исходя из формул зависимости асимметрии молекул от их вязкости [7], нетрудно видеть, что подобные изменения обеспечиваются 30%-ным сокращением молекулы. С другой стороны, известно [8], что переход ДНК из *B*- в *A*-конфигурацию также сопровождается 30%-ным сокращением молекулы. Можно думать, что подобные конфигурационные изменения имеют место при комплексовании молекул ДНК и белка. Согласно этому, в работе одного из нас ранее [7] было выдвинуто предположение, что в дезоксирибонуклеопротеиде белок и нуклеиновая кислота находятся в *A*-*A*-конфигурациях соответственно.

Правда, можно было бы думать, что подобные изменения могут быть обусловлены и чисто гидратационными или конфигурационными изменениями в смысле изменения гидродинамической формы молекулы благодаря повороту отдельных сегментов. Однако замечательное постоянство значения вязкости и соответствующее ему сокращение молекул ДНК в зависимости от качества белка, соединившегося с ДНК, и от его количества в довольно широком пределе (от $N/P = 2$ до $N/P = 15$) заставляет предположить, что вынуждающая деформация молекулы ДНК имеет совершенно определенные пределы с вполне дискретными крайними точками. Такими дискретными состояниями ДНК и являются, с нашей точки зрения, *A*- и *B*-конфигурации ДНК. Как отмечено в работе одного из нас [7], для асимметрии молекул высоко-

полимеров (при $\frac{a}{b} \gg 2$) с достаточной степенью точности применимо выражение

$$\frac{a}{b} = 34,7 \sqrt{\frac{[\eta]}{\bar{v}}}, \quad \text{где } \bar{v} - \text{удельный парциальный объем. Приведенное в ли-}$$

тературе значение $\bar{v} = 0,65 \text{ см}^3/\text{г}$ для ДНП [9] дает изменения $\frac{a}{b}$ по сравнению с соответствующей асимметрией ДНК не более 10%. Это позволяет считать, что асимметрия молекулы ДНП обуславливается с точностью до 10% асимметрией ДНК, входящей в ДНП. Из этого следует, что и двукратное падение вязкости в 30%-ное сокращение молекулы ДНП (по сравнению с ДНК) полностью обуславливается конформационными изменениями последней при соединении ее с белком, что дает основание применять к ДНП расчетный аппарат, предложенный для молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.

На основании всего сказанного ясно, что молекулярный вес ДНК, входящий в ДНП, можно выразить, измерив вязкость ДНП и увеличив ее в 2 раза. Действительно, одним из нас [7] было показано, что для ДНК выполняется соотношение:

$$[\eta]_{\text{ДНК}} = 9,0 \cdot 10^{-6} M_{\text{ДНК}}. \quad (1)$$

откуда для ДНП имеем:

$$[\eta]_{\text{ДНП}} = 4,5 \cdot 10^{-6} M, \quad (2)$$

где $[\eta]_{\text{ДНП}}$ — число предельной вязкости дезоксирибонуклеопротейда, а M — молекулярный вес, входящий в ее состав дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Так как в молекулу дезоксирибонуклеопротейда входит только одна молекула нуклеиновой кислоты, то представляется возможным рассчитать молекулярный вес комплекса, исходя из молекулярного веса входящей в него ДНК.

Действительно, зная весовое отношение азота к фосфору (N/P) выделенного препарата и приняв, что % азота в нуклеопротейде равен 16%, а фосфора в ДНК равен 9,8%, путем несложных расчетов получим, что молекулярный вес нуклеопротейда

$$M_{\text{ДНП}} = 0,607 \frac{N}{P} M_{\text{ДНК}}, \quad \text{или, подставив значение молекулярного веса дезоксирибонуклеиновой кислоты, входящей в состав нуклеопротейда, по вязкости ДНП получим:}$$

$$M_{\text{ДНП}} = 1,4 \cdot 10^6 \cdot N/P \cdot [\eta]_{\text{ДНП}}. \quad (3)$$

Сравнение экспериментального и теоретического материала можно привести по работе Доти и Зубай [6], в которой приводятся данные по молекулярному весу ДНП, определенному методом светорассеяния в $19 \pm 4 \cdot 10^6$ при $N/P = 3,7 \pm 0,3$ и $[\eta] = 35 \pm 2$. Из формулы (3) видно, что только по данным N/P и $[\eta]$ молекулярный вес ДНП можно оценить порядка $18,2 \cdot 10^6$. По формуле (2) молекулярный вес ДНК, входящей в ДНП, можно оценить порядка $7,8 \cdot 10^6$, что также находится в хорошем согласии с данными Доти и Зубай, определившими этот молекулярный вес по светорассеянию порядка $(8 \pm 2) \cdot 10^6$.

Мы считаем необходимым также кратко остановиться на работах Садрона [10] и Пойета с Вайлем [11], которые отметили, что существует два типа ДНК — C_1 и C_2 по типам зависимости $[\eta] = f(M)$. Большинство из известных ДНК тканевого происхождения принадлежат к группе C_1 и подчиняются уравнению (1). Вторая же, значительно меньшая группа молекул ДНК — C_2 , как нам представляется, является артефактом. Это молекулы ДНК, которые в силу тех или иных причин остались в третичной конфигурации [6], специфичной для ДНП, несмотря на то, что почти полностью освобождены от белка. В этом случае можно было бы ожидать, что тип молекул ДНК — C_2 должен подчиняться уравнению (2). Действительно, в цитированных работах большинство из приведенных экспериментальных точек на кривых зависимости $[\eta] = f(M)$ подчиняются соотношению (2).

На основании всего изложенного можно прийти к выводу, что конформационные изменения молекул ДНП при образовании последнего из ДНК и белка, следствием чего является удвоенная величина вязкости ДНК по сравнению с ДНП, дают возможность рассчитывать молекулярные веса ДНП и входящих в них ДНК без выделения последних из нуклеопротейдов.

Кроме того, как следует из ранее сказанного, представляется возможным рассчитывать асимметрию ДНП, пользуясь формулой, предложенной для асимметрии молекул ДНК [7] (с учетом возможной ошибки $\pm 10\%$).

В заключение необходимо отметить, что вязкость ДНП лучше всего измерять в 0,5—1 М растворе NaCl, так как в 0,2 М NaCl, в которых измеряют вязкость ДНК, ДНП выпадает в осадок. Концентрация ДНП при измерении вязкости не должна превышать 0,004%, что следует из ряда соображений, приведенных в предыдущих сообщениях [7; 12].

Поступила в редакцию
6. XII. 1967

ЛИТЕРАТУРА

1. Тонгур В. С., Дискина Б. С., Спитковский Д. М., Биохимия, 22, 1952.
2. Дискина Б. Т., Спитковский Д. М., Биофизика, 3, 1958.
3. Дискина Б. С., Спитковский Д. М., Тонгур В. С., Биохимия, 23, 1958.
4. Cohen S. S., J. Biol. Chem., 158, 255, 1945.
5. Doty P., Zubay G., J. Amer. Chem. Soc., 78, 6207, 1956.
6. Спитковский Д. М., Тонгур В. С., Дискина В. С., Биофизика, 3, 2, 1958.
7. Спитковский Д. М., Биофизика (в этом номере).
8. Watson J. D., Crick F. H. C., Cold Spring Harbor Simpos. Quant. Biol., 18, 123, 1953.
9. Oth A., Proc. 3-rd. Intern. Congr. Biochem., Brussels 1955, Pub., N. Y., 1956.
10. Sadron C., Proc. 3-rd. Intern. Congr. Biochem., Brussels 1955, Pub., N. Y., 1956.
11. Pouyet J., Weill G., J. Polymer Sci., 23, 739, 1957.
12. Спитковский Д. М., Биофизика, 1, 319, 1956.

**DETERMINATION OF THE MOLECULAR WEIGHT OF
DESOXYRIBONUCLEOPROTEID AND THE DESOXYRIBONUCLEIC ACID
CONTAINED IN THE LATTER, ACCORDING TO THE VISCOSIMETRIC METHOD**

D. M. SPITKOVSKY, P. I. TZEITLIN

Analysis of experimental and theoretical data, regarding the two-fold viscosity magnitude of DNA contained in DNP, as compared to the viscosity of the latter, permitted to find the ratio for determining the molecular weight of DNA in DNP, without first isolating it from the former.

$$[\eta]_{\text{DNP}} = 4.5 \cdot 10^{-6} M_{\text{DNA}}$$

We found also the ratio for determining the molecular weight of DNP, according to its viscosity and to the Nitrogen — Phosphorus proportion (N/P).

$$M_{\text{DNP}} = 1.4 \cdot 10^5 \cdot \frac{N}{P} \cdot [\eta]_{\text{DNP}}$$

in which $[\eta]$ — the limiting viscosity number is always expressed by: $\frac{100 \text{ cm}^3}{\text{g}}$

Received: 6. XII. 1957

Академия Наук СССР

Биофизика

Том III, вып. 4, 1958 г.

Д. М. Спитковский

К ВОПРОСУ ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
ПАРАМЕТРОВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ
МЕТОДОМ ВИСКОЗИМЕТРИИ

D. M. Spitkovski

DNA - viscometry - molecular parameters

БИОФИЗИКА

Том III, вып. 4

1958

К ВОПРОСУ ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Д. М. СНИТКОВСКИЙ

Институт экспериментальной биологии АМН СССР, Москва

В сообщении [1] мы дали вывод соотношениям между молекулярным весом (M) и характеристической¹ вязкостью $[\eta]$ для молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В диапазоне молекулярных весов $3 \cdot 10^6$ — $6 \cdot 10^6$ это соотношение хорошо выполняется, однако для более низких и более высоких значений последнего наблюдается расхождение между молекулярными весами ДНК, определенными по светорассеянию и вычисленному из значений $[\eta]$. Это несоответствие объясняется, по всей вероятности, тем, что введенная нами эмпирическая поправка [1] дает значение a в соотношении $[\eta] = KM^a$, более близкое для единичных полинуклеотидных цепей, чем для двуспиральной молекулы ДНК [2]. Кроме того, при вычислении величины сегмента ДНК мы исходили из единичной полинуклеотидной цепи. Естественно, что двуспиральная молекула ДНК более жестка [3] с соответственно большим сегментом. Действительно, расчет величины сегмента [1] по соотношению $\bar{R}^2/\bar{A}^2 = a$ при учете свободного вращения и двухтяжевой структуры ДНК дает минимальное количество нуклеотидов в сегменте молекулы ДНК (a) порядка 140—160. Необходимо отметить, что величина угла внутреннего вращения при вычислениях взята весьма ориентировочно [1;4], так как в настоящее время в литературе [3] нет указаний, вокруг каких связей осуществляется вращение вдоль цепи главных валентностей молекулы ДНК.

Примерно такое же количество нуклеотидов (80—150) в сегменте ДНК имеет место при учете того положения, что в среднем отношении максимальной длины цепи к наиболее вероятной ее протяженности вне зависимости от различий во внутренних структурах линейных макромолекул равно $0,5 N^{1/2}$ (где N — в нашем случае — составляет $1/2$ степени полимеризации ДНК) [6].

Величину такого же порядка мы получаем, моделируя молекулы ДНК и ДНП. В самом деле, судя по нашим и литературным данным [3] и исходя из относительно большой высокоэластической деформации ДНП [3;7—11], нужно полагать, что между молекулами белка, лежащими на ДНК, имеются определенные промежутки, вокруг которых и осуществляется внутреннее вращение по цепи главных валентностей молекулы ДНК. Так как количество низкомолекулярного гистона позволяет расположиться ему на молекуле ДНК в полностью вытянутой β -конфигурации [3] и учитывая, что молекулярный вес гистона порядка 9000 [3], а средний молекулярный вес аминокислоты 125, мы можем заключить, что одна молекула указанного белка, располагаясь на ДНК, соответствует геометрически 36 нуклеотидам $\left(\frac{9000}{125} = 72\right)$. Эта величина мала по сравнению с выше-

¹ В соответствии с рекомендацией комиссии по макромолекулам Международного союза теоретической и прикладной химии слова «характеристическая вязкость» («intrinsic viscosity») должны быть заменены словами «число предельной вязкости» («limiting viscosity number»). В данной работе мы вводим это название [5].

Определение некоторых молекулярных параметров ДНК методом вискозиметрии 397

указанным значением сегмента. Отсюда можно заключить, что между связями в молекуле ДНК, вокруг которых осуществляется вращение, размещается по крайней мере четыре молекулы низкомолекулярного гистона, соответствующие геометрическому месту 144 нуклеотидов. Кроме того, данные ряда работ [12; 13] по энергии активации ДНК в 60—93 ккал позволяют по соотношению $\frac{U}{RT} = a$ [1] оценить величину сегмента ДНК (в расчете на единичную полинуклеотидную цепь) в 100—156 нуклеотидов вне зависимости от молекулярного веса, так как вышеуказанная величина потенциального барьера определяется только энергией взаимодействия соседних радикалов и типом связи. Правда, эта величина может варьировать при переходе от одного растворителя к другому.

Наконец, следует указать, что вслед за нашей работой [1] вопрос о сегментах ДНК был совсем недавно поднят в сообщении Райса и Доти [14] на основании экспериментальных данных по величине энергии активации при денатурации молекул ДНК. Для образцов ДНК, полученных разными методами, но из одного источника, энергия активации лежит в диапазоне 35—93 ккал. При денатурации ДНК происходит разрыв водородных связей между основаниями. При сопоставлении с другими системами, связанными Н-связями, ясно, что энергия активации таких реакций на пару оснований должна находиться в диапазоне 1—10 ккал. Если учесть, что в молекуле ДНК примерно 10 000 пар оснований, то величина энергии активации всей молекулы должна была бы принять значение 10^4 — 10^5 ккал, что во много раз превышает экспериментальные значения. Исходя из этого, авторы цитируемой работы считают, что процесс денатурации ДНК в своем начальном этапе затрагивает только 1 сегмент последней, состоящей из 10—100 пар оснований, причем нужно ожидать, что сегмент с 10—50 парами оснований относится к молекулам с менее стабильными или нарушенными в результате тех или иных причин Н-связями, а сегмент с 50—100 парами оснований — к нативной ДНК.

Таким образом, мы видим, что различные способы определения величины сегмента молекулы ДНК позволяют оценить его размеры в 130—160 нуклеотидов, что примерно согласуется с величиной минимальной химической единицы ДНК [3]. За точное численное значение величины сегмента мы принимаем величину в 144 нуклеотида, соответствующую геометрическому месту четырех молекул низкомолекулярного гистона (или одной молекулы гистона с M , равным 3500), находящихся в полностью вытянутой β -конфигурации.

В этом случае, аналогично предыдущему сообщению [1], рассматривая чисто геометрически идеализированную полинуклеотидную цепь с сегментом, отвечающим реальной двухтяжевой молекуле ДНК, имеем

$$[\eta] = \frac{\Phi (\bar{R}^2)^{1/2}}{M \cdot q_\Phi}, \quad (1)$$

где $\Phi = \text{const} = 2,1 \cdot 10^{21}$, и так как

$$N_c = \frac{M}{M_c},$$

где N_c — степень полимеризации сегментов с молекулярным весом M_c , $R^2 = N_c b^2$, где b — длина сегмента, окончательно получаем:

$$M = \frac{[\eta]^2 M_c^3 \cdot q_\Phi^2}{\Phi^2 b^2}.$$

Фактор полидисперсности q_Φ может быть оценен величиной 1,95, так как полидисперсность ДНК подчиняется соотношению $M_n : M_w : M_z = 1 : 2 : 3$ [15], и тогда:

$$[\eta] = 40 \cdot 10^{-4} M^{0.5} \quad (2)$$

Однако, согласно Флори [16], значение α в выражении $[\eta] = KM^\alpha$, равное 0,5, соответствует Θ -точке, физический смысл которой состоит в том, что при какой-то температуре Θ (точка Флори) взаимодействие отдельных сегментов цепи между собой в неактивном растворителе не влияет на размеры молекулы, и последняя имеет наиболее компактную упаковку.

Для растворов, не находящихся в Θ -точке по Флори [16],

$$[\eta] = K_1 M^{0.5} \beta^3 = KM^\alpha. \quad (3)$$

Так как величина $[\eta]$ имеет размерность объема на единицу веса и пропорциональна эффективному объему изолированной молекулы в растворе, деленному на ее молекулярный вес, то величину β^3 можно рассматривать как фактор увеличения объема некоторой беспорядочно свернутой молекулы с невозмущенным средним значением квадрата расстояния между концами молекулы \bar{R}_0^2 , а β — как соответственный коэффициент «линейного расширения» молекул, равный

$$\beta^3 = \frac{[\eta]}{[\eta]_\Theta} = \frac{(\bar{R}^2)^{1/2}}{(\bar{R}_0^2)^{1/2}},$$

где $[\eta]_\Theta$ — число предельной вязкости (ЧПВ) в Θ -точке. Однако, что представляется нам вполне убедительным, молекула, состоящая из нескольких сегментов, и в Θ -точке имеет вытянутую конфигурацию и, вообще говоря, у такой молекулы способность к изменению конфигурации должна быть выражена чрезвычайно слабо. Естественно, что в этом случае прямые, соответствующие логарифмической форме уравнений $[\eta] = K_1 M^{0.5} \beta^3$ (последнему соответствует равенство $[\eta] = KM^\alpha$) и $[\eta] = K_1 M^{0.5}$, должны пересечься в какой-то S -точке. Можно оценить такой неспособный к изменению конфигурации при переходе в Θ -точку отрезок ДНК величиной порядка двух сегментов ДНК [3], что соответствует величине M в 200 тыс. Это значение совпадает с молекулярным весом элемента Куна для макромолекулярной цепи ДНК, рассчитанного по теории светорассеяния [15]. Следовательно, ЧПВ ДНК в S -точке, согласно формуле (2), равно 1,8. Из литературных данных [15; 17—20] ($\alpha = 0,93; 0,93; 1,0; 1,08; 1,00$) можно оценить значение α для ДНК величиной порядка 1, что вполне естественно для жестких асимметричных молекул. Переводя уравнение (2) в логарифмическую формулу и зная величину α в уравнении (3), мы можем найти полное численное решение последнего по известной S -точке и углу α :

$$[\eta] = 9,0 \cdot 10^{-6} \cdot M. \quad (4)$$

Таким образом, из выражения (4) видно, что зависимость $[\eta] = f(M)$ для ДНК подчиняется уравнению Штаудингера.

Комбинируя уравнения (1) и (4) (при $q_\Phi = 1$), получаем зависимость между средним квадратичным расстоянием и M и $[\eta]$ соответственно:

$$\sqrt{\bar{R}^2} = 0,162 M^{1/2} \quad (5)$$

$$\text{и } \sqrt{\bar{R}^2} = 376 [\eta]^{1/2}. \quad (6)$$

В ряде работ [21; 22] отмечено, что существуют два типа молекул ДНК — C_1 и C_2 по зависимости $[\eta] = f(M)$. Полученные результаты относятся к ДНК типа C_1 , охватывающего большинство исследованных нуклеиновых кислот. ДНК типа C_2 , как нам кажется, представляет собой преформированный тип C_1 . Подробнее на этом обстоятельстве мы остановимся в другом месте [23].

Как видно из таблицы, предложенные нами формулы (4), (5) и (6) полностью оправдываются при сравнении величин M , $\sqrt{\bar{R}^2}$ и $[\eta]$, определенных другими независимыми методами, и действительны в диапазоне молекулярных весов ДНК $(0,1—10) \cdot 10^6$.

Определение некоторых молекулярных параметров ДНК методом вискозиметрии 399

Ссылка на литературу	Молекулярный вес, $\times 10^{-6}$		Среднее квадратичное расстояние между концами молекулы, $\sqrt{R^2 A}$		Число предельной вязкости $[\eta]$, 100 cm^3/g		Асимметрия молекул, a/b		
	по литературным данным	по формуле (4)	по литературным данным	по формуле (6)	по литературным данным	по формуле (4)	по Кууну	по Польсону	по формуле (10)
[17]	0,48*	0,45		995	4,0	4,3	112	89	97,5
[17]	0,56*	0,50		1100	4,5	5,0	120	96	105
[17]	0,60*	0,66		1150	5,6	5,4	125	100	109
[17]	0,97*	0,98		1580	8,9	8,75	159	127	139
[1]	2,5		4000	3000		22,5	256	204	223
[1]	3,5	3,42	4000	3740	30,7	31,4	310	242	263
[24]	3,5	3,45		3740	31,0	31,5	314	243	264
[24]	4,2	4,22	4730	4220	38,0	37,8	322	264	289
[1]	4,4			4350		39,6	336	271	295
[21]	4,6	4,78	4990	4770	43,0	41,5	347	277	303
[1]	4,65		4480	4500		42,0	350	279	305
[1]	4,7			4530		42,3	354	280	306
[17]	5,0*	4,6		4730	41	45	362	289	315
[1]	5,8	5,65		5200	50,6	52,1	389	310	339
[14]	5,85	5,88		5250	53	52,6	391	312	340
[1]	5,85	5,93	4950	5250	53,4	52,6	391	312	340
[1]	5,9	5,7	5400	5280	51,0	53,1	394	314	343
[21]	6,0	5,92		5350	53,3	54	396	316	345
[25]	6,18		5230	5425		54,7	398	318	347
[25]	6,47		5480	5530		58,2	411	328	359
[25]	6,48		5410	5570		58,3	411	328	360
[14]	6,6	6,8		5650	62	59,4	416	332	362
[1]	6,85		5030	5800		61,6	425	338	368
[1]	6,87		5030	5820		61,8	426	339	369
[1]	7,7		7100	6300		69,3	449	368	391
[22]	7,7	6,7		6300	60,0	69,3	449	358	391
[24]	7,7	8,0		6300	72	69,5	450	359	392
[24]	7,7	8,0		6300	72	69,5	450	359	392
[26]	8,2 \pm 2	7,8		6600	70 \pm 2	73,8	463	370	403
[14]	8,2	8,0		6600	72	73,8	463	370	403

* Средняя величина, вычисленная из уравнений Перрина и Мендельсона-Флори [17].

Кроме вышесказанного, нам представляется возможным вывести более простое выражение для вычисления асимметрии молекул высокомолекулярных соединений, в частности ДНК. Действительно, подставляя значение M из выражения (1) (при $q_\phi = 1$) в известное соотношение $\frac{M\bar{v}}{N} = \frac{4}{3} \pi a b^2$, где \bar{v} — удельный парциальный объем молекулы полимера (равный для ДНК 0,55 [27]), N — число Авагадро, a и b — большая и меньшая полуоси молекулы соответственно, имеем:

$$\frac{(\bar{R}^2)^{1/2} \cdot \Phi \bar{v}}{[\eta] \cdot N} = \frac{4}{3} \pi a b^2. \quad (7)$$

Однако, если учесть, что при $\frac{a}{b} \gg 2$ радиус вращения (R_g) эквивалентного эллипсоида вращения примерно равен $a/\sqrt{5}$, а для беспорядочно свернутой цепи он равен $\sqrt{R^2/6}$, можно написать

$$a \approx \sqrt{R^2}, \quad (8)$$

что вполне подтверждается экспериментом [25]. Подставляя значение $\sqrt{R^2}$ из (8) в выражение (7), получаем:

$$\frac{a}{b} = \sqrt{\frac{4\pi N \cdot [\eta]}{3\Phi \bar{v}}},$$

т. е.

$$\frac{a}{b} = 34,7 \sqrt{[\eta]} \quad (9)$$

$$\text{при } \frac{a}{b} \gg 2$$

и для ДНК:

$$\frac{a}{b} = 47 \sqrt{[\eta]} \quad (10)$$

$$\text{при } \frac{a}{b} \gg 2.$$

Значения $[\eta]$ в (2,4—6,9 и 10) даны в $100 \text{ см}^3/\text{г}$.

Величины асимметрии молекул ДНК, рассчитанные по формуле (10), хорошо согласуются с соответствующими параметрами, найденными по формуле Куна [28], Польсона [29] (таблица), а также находится в соответствии с численными значениями, полученными из уравнения Симха [30], при учете, что 1 г сухой Na-соли ДНК связывает 0,35 г H_2O [31], т. е. что инкремент вязкости (γ) следует увеличить в 1,64 раза.

Анализ формулы (10) позволяет сделать следующее заключение. В ряде работ было показано [10; 11; 26], что вязкость ДНП примерно в 2 раза ниже соответствующей вязкости ДНК. В этом случае, считая, что асимметрия ДНП в основном обусловлена входящей в нее ДНК [23], молекула ДНП сократится по отношению к ДНК в $\sqrt{2}$ раза, т. е. примерно на 30%. С другой стороны, известно, что молекулы ДНК могут находиться в двух конфигурациях: кристаллической А и паракристаллической — В, причем первая короче конфигурации В на 30% и образуется при довольно низкой относительной влажности (порядка 75%). Если проекция длины нуклеотида в В-конфигурации — 3,4 Å, то в А-конфигурации она равна 2,55 Å. Считают [32], что белок соединяется с ДНК в В-конфигурации, так как, по Астбери [33], наблюдается стерическое соответствие расстояний между боковыми группами в белке и между нуклеотидами в ДНК (по 3,4 Å).

Однако, с нашей точки зрения, имеется еще не менее интересное соответствие. Действительно, период идентичности белка в α-конфигурации — 5,1 Å — точно соответствует расстоянию двух нуклеотидов по оси молекулы ДНК в А-конфигурации — 5,1 Å.

Можно думать, что ДНК, находящаяся в В-конфигурации, разворачивает белок до β-конфигурации и соединяется с ним. При этом последний дегидратирует ДНК, результатом чего является ее сжатие до А-конфигурации; ДНК же, в свою очередь, стягивает белок до α-конфигурации, причем опять наблюдается замечательное стерическое соответствие (дипептид белка — 5,1 Å и динуклеотид — 5,1 Å). Таким образом, переход ДНК → ДНП соответствует переходу ДНК из В-в А-конфигурацию, белка из β-в α-конфигурацию. Этот переход сопровождается 30-%ным сокращением молекулы ДНК. Очевидно, что для соответствующей дегидратации ДНК необходимо и достаточно 18% белка от веса ДНП, так как при этом наблюдается инверсия ДНК в ДНП [3].

В заключение мы считаем необходимым отметить, что вязкость следует измерять при начальной концентрации ДНК с приблизительным значением 0,004% в 0,2 М растворе NaCl для исключения взаимодействия молекул (теоретически последнее исключается при концентрации ДНК 0,0028% [25]) и снятия электровязкозного эффекта, который возникает при наличии на молекуле ДНК значительного свободного заряда в растворе с малой ионной силой, а также по другим соображениям, изложенным в нашем предыдущем сообщении [1].

Определение некоторых молекулярных параметров ДНК методом вискозиметрии 401

Выводы

1. На основании четырех независимых методов выведено значение величины сегмента молекулы ДНК.
2. Выведены соотношения для ДНК между числом предельной вязкости и молекулярным весом (4), средним квадратичным расстоянием между концами молекулы и молекулярным весом (5) и вязкостью (6) соответственно.
3. Выведено выражение для расчета асимметрии молекул высокомолекулярных соединений (при $a/v \gg 2$) (9) и для дезоксирибонуклеиновой кислоты, в частности (10).
4. На основании экспериментальных и расчетных данных показано, что между ДНК в А- и белком в α -конфигурациях имеется стерическое соответствие, и высказано предположение, что в дезоксирибонуклеопротеиде ДНК и белок находятся в А-, α -конфигурациях соответственно.

Поступила в редакцию
6. XII. 1957

ЛИТЕРАТУРА

1. Спитковский Д. М., Биофизика, 1, 319. 1956.
2. Thomas C. A., Doty Jr. P., J. Amer. Chem. Soc., 78, 1854. 1956.
3. Спитковский Д. М., Тонгур В. С., Дискина Б. С., Биофизика, 3, 2. 1958.
4. Astbery W. C., Sympos. Soc. Exptl. Biol., 1, 75. 1947.
5. Мак-Гори Т. Е., Марк Г., Физические методы органической химии, ИЛ, М., 5, 312. 1957.
6. Гут Э., Джемс Г., Марк Г., Химия больших молекул. Сборник 1, ИЛ, М., 72. 1948.
7. Спитковский Д. М., Биохимия, 20, 566. 1955.
8. Тонгур В. С., Дискина Б. С., Спитковский Д. М., Биохимия, 22, 5. 1957.
9. Тонгур В. С., Голубева Н. П., Дискина Б. С., Спитковский Д. М., Филиппова Г. В., Биофизика, 2, 469. 1957.
10. Дискина Б. С., Спитковский Д. М., Тонгур В. С., Биохимия, 23, 3. 1958.
11. Дискина Б. Т., Спитковский Д. М., Биофизика, 3, 1958 (в печати).
12. Decker C. A., Schachman H. K., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 40, 894. 1954.
13. Doty P., Rice S. A., Biochim. et Biophys. acta, 18, 446. 1955.
14. Rice S. A., Doty P., J. Amer. Chem. Soc., 79, 3937. 1957.
15. Doty P., J. Cell. a. Comp. Physiol., 49, 27. 1957.
16. Krigbaum W. R., Flory P. J., J. Polymer. Sci., 11, 37. 105.
17. Kawade Y. a. Watanabe J., Biochim. et Biophys. acta, 19, 513. 1956.
18. Cox R. A., Owerend W. G., Peacocke A. R. a. Wilson S., Nature, 178, 919. 1955.
19. Thomas C. A. Jr., J. Amer. Chem. Soc., 78, 1861. 1956.
20. Shooter K. V., Nature, 178, 1320. 1956.
21. Pouet J., Weill G., J. Polymer. Sci., 23, 739. 1957.
22. Sadron C., Proc. 3-rd. Intern. Congr. Biochem., 12, Brussels. 1955; Pub. N. Y. 1956.
23. Спитковский Д. М., Цейтлин П. И., Биофизика, 3, 369. 1958.
24. Doty P., Proc. 3-rd. Intern. Congr. Biochem., 135, Brussels. 1955; Pub. N. Y., 1956.
25. Reichmann M. E., Rice S. A., Thomas C. A. a. Doty P., J. Amer. Chem. Soc., 78, 3047. 1954.
26. Doty P., Zubay G., J. Amer. Chem. Soc., 78, 6207. 1956.
27. Cecil R., Ogston A. G., J. Chem. Soc., 1382. 1948.
28. Kuhn W., Kolloid-Z., 62, 269. 1933.
29. Polson A., Kolloid-Z., 88, 51. 1939.
30. Эдсала Дж., Белки, ИЛ, М., 2, 310. 1956.
31. Wang J. H., J. Amer. Chem. Soc., 77, 258. 1955.
32. Feughelman M. et al., Nature, 175, 834. 1955.
33. Astbery W. T., Bell F. O., Nature, 141, 747. 1938.

ON THE PROBLEM OF THE DETERMINATION OF SOME MOLECULAR PARAMETERS IN DESOXYRIBONUCLEIC ACID ACCORDING TO THE VISCOSIMETRIC METHOD

D. M. SPITKOVSKI

Data [1] obtained in applying calculation methods of static physics of highly polymeric compounds, regarding DNA activation energy values [2], and based on the modeling of the DNA molecule [3], permitted to draw the conclusion that the DNA native molecular segment consists of 144 mononucleotides. This and Flory & Fox' equation, we modified, enabled us to find the relation between the molecular weight and the limiting viscosity number in DNA molecules in the Θ point: $[\eta] = 40 \cdot 10^{-4} M^{0.5}$ as well as outside this point: $[\eta] = 9.0 \cdot 10^{-4} M$. We found, besides, the dependence of the square root of the average distance between the ends of the DNA molecule upon the molecular weight of the latter ($\sqrt{R^2} = 0.162 M^{1/2}$) and upon its limiting viscosity number $\sqrt{R^2} = 376 [\eta]^{1/2}$. The correctness of the established dependence was confirmed in 30 samples in which M and $\sqrt{R^2}$ were found by quite other methods. The dependence of the molecular asymmetry in highly polymeric compounds upon the limiting viscosity number was also determined: $\frac{a}{b} = 34.7 \sqrt{\frac{[\eta]}{v}}$ in which \bar{v} — is the specific partial volume of the highly polymeric molecules at $\frac{a}{b} \gg 2$ and, in particular in DNA, $\frac{a}{b} = 47 \sqrt{[\eta]}$.

It was likewise demonstrated, in the 30 samples, that $\frac{a}{b}$ values, calculated according to the suggested formule, are intermediate between the corresponding values obtained according to Kuhn and to Polson and that they are also in good conformity with those calculated by means of Simha's formule.

It was also disclosed that there is a stereochemical correspondence between DNA in the A configuration and the protein in the α -configuration (5.1 Å — dinucleotid and 5.1 Å — dipeptid) and the suggestion is expressed, on the basis of the 30% of the DNA molecule when it passes from the B configuration to the A-configuration, and of a similar 30% when it unites with protein, that DNA and protein molecules are respectively in the A- and in the α -configuration in the nucleoproteid.

Received: 6. XII. 1967